

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620131152537

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

OVOL2 在结直肠癌细胞中调控上皮间质转化过程的分子机制研究

Mechanism Study of OVOL2 Regulating
Epithelial-Mesenchymal Transition in Colorectal Cancer
Cell

焦朋

指导教师姓名: 李博安教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2016 年 5 月

论文答辩时间: 2016 年 5 月

学位授予日期: 2016 年 6 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(李博安)课题(组)的研究成果,获得(李博安)课题(组)经费或实验室的资助,在(李博安)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要.....	7
Abstract.....	8
前言.....	10
1.1 Wnt 信号通路概述	10
1.1.1 Wnt 信号通路的发现	10
1.1.2 Wnt 信号通路的分类	10
1.1.3 经典 Wnt 信号通路	11
1.1.4 β -catenin 蛋白简介	12
1.1.5 LEF/TCF 蛋白简介.....	13
1.1.6 经典 Wnt 信号通路的靶基因	14
1.2 上皮间质转化过程概述.....	14
1.2.1 上皮间质转化概念的提出	14
1.2.2 上皮间质转化的分类及生物学意义	15
1.2.3 上皮间质转化的调控网络	17
1.2.4 上皮间质转化与 Wnt 信号通路之间的关系	19
1.3 OVO 蛋白的结构与功能.....	20
1.3.1 Ovo 基因与 OVO 的蛋白结构.....	20
1.3.2 Ovo 蛋白的生物学功能	21
材料与方法	23
2.1 溶液配方.....	23
2.2 抗体信息.....	27
2.3 核酸相关实验方法.....	28
2.3.1 大肠杆菌感受态细胞制备	28
2.3.2 DNA 转化	29
2.3.3 质粒抽提	29
2.3.4 目的片段克隆	31

2.3.5 限制性内切酶消化 DNA 片段	32
2.3.6 DNA 片段连接反应	33
2.3.7 DNA 样品琼脂糖凝胶电泳	33
2.3.8 琼脂糖凝胶回收目的 DNA 片段	34
2.3.9 细胞基因组 DNA 的提取	34
2.3.10 Tripure 法提取 RNA.....	37
2.3.11 RNA 的反转录.....	37
2.3.12 实时荧光定量 PCR.....	38
2.4 蛋白相关实验方法.....	39
2.4.1 细胞总蛋白提取	39
2.4.2 核浆分离	40
2.4.3 蛋白免疫印迹	40
2.4.4 免疫共沉淀	42
2.4.5 两步法免疫共沉淀	42
2.4.6 GST-pulldown	43
2.4.7 染色质免疫共沉淀	44
2.4.8 荧光素酶检测	46
2.4.9 凝胶迁移实验	47
2.4.10 银染	49
2.4.11 HDAC 酶活力检测	50
2.5 细胞相关实验方法.....	51
2.5.1 本文中所用部分细胞系	51
2.5.2 细胞冻存	51
2.5.3 细胞复苏	52
2.5.4 细胞传代	52
2.5.5 PEI 转法	52
2.5.6TurboFect 悬浮转染法	52
2.5.7 脂质体转染	53
2.5.8 慢病毒的包装与感染	53
2.5.9 细胞划痕	54
2.5.10 细胞侵袭实验	54

2.5.11 细胞计数	54
2.5.12 免疫荧光	55
结果与讨论	56
3.1 OVOL2 在结直肠癌细胞中抑制 EMT 进程.....	56
3.1.1 OVOL2 与 EMT 进程的标志物 E-cadherin 在转录水平存在高度相关性	56
3.1.2 OVOL2 在各结直肠癌细胞系中表达存在差异性	57
3.1.3 OVOL2 在结直肠癌细胞系中能够抑制 EMT 进程.....	59
3.2 OVOL2 在结直肠癌细胞中主要通过下调 SLUG 抑制 EMT 进程.....	63
3.2.1 OVOL2 的潜在下游靶向蛋白 SLUG 及 ZEB1	63
3.2.2 SLUG 作为 OVOL2 的靶基因能够回补 OVOL2 含量变化在 EMT 过程中带来的影响	65
3.3 OVOL2 在结直肠癌细胞中抑制 SLUG 的分子机制.....	67
3.3.1 OVOL2 通过抑制 WNT 信号通路活性抑制 SLUG	67
3.3.2 OVOL2 含量变化不影响 WNT 信号通路核心组分 β -catenin 的表达 ...	69
3.3.3 OVOL2 可以与 β -catenin 及 TCF4 直接结合	70
3.3.4 OVOL2 不影响 β -catenin 与 TCF4 的结合	72
3.3.5 OVOL2 不影响 TCF4 与 DNA 的结合	73
3.3.6 OVOL2 能够与 β -catenin, TCF4 及 HDAC1 形成转录复合体	74
3.4 OVOL2 启动子受到甲基化调控导致其在结直肠癌晚期细胞中低表达.....	80
3.4.1 OVOL2 甲基化位点的发现及甲基化引物的设计	80
3.4.2 OVOL2 启动子在 Dukes 分级高的结直肠癌中存在较高的甲基化水平	81
讨论与展望	84
参考文献	87
致谢.....	92

TABLE OF CONTENT

Abstract in Chinese.....	7
Abstract.....	8
Introduction.....	10
1.1 Review of WNT Signaling Pathway.....	10
1.1.1 Discovery of WNT Pathway.....	10
1.1.2 Classification of WNT Pathway	10
1.1.3 Classical WNT Pathway	11
1.1.4 Introduction of β -catenin	12
1.1.5 Introduction of LEF/TCF	13
1.1.6 Target Genes of Classical WNT Pathway	14
1.2 Review of EMT.....	14
1.2.1 What is EMT	14
1.2.2 Classification and Biological Significance of EMT	15
1.2.3 Regulatory Network of EMT.....	17
1.2.4 EMT and WNT Signaling Pathway.....	19
1.3 Structure and Function of OVO Protein.....	20
1.3.1 Ovo Gene and OVO Protein Structure	20
1.3.2 Biological Function of OVO Protein.....	21
MATERIALS AND METHODS	23
2.1 Solution Components	23
2.2 Antibody.....	27
2.3 Methods on Nuclear Acid	28
2.3.1 Preparation of Competent Cell E.coli.....	28
2.3.2 Plasmids Transformation.....	29
2.3.3 Extraction of Plasmids DNA	29
2.3.4 Target DNA Fragments Cloning	31

2.3.5 DNA Digestion	32
2.3.6 DNA Ligation	33
2.3.7 Agarose Gel Electrophoresis of DNA	33
2.3.8 DNA Recovery from Agarose Gel	34
2.3.9 Extraction of Genomic DNA	34
2.3.10 Extraction of RNA.....	37
2.3.11 Reverse Transcription of RNA	37
2.3.12 Real-time Fluorescence Quantification PCR.....	38
2.4 Methods on Protein	39
2.4.1 Whole Lysate Preparation	39
2.4.2 Extractions of Differert Cell Compentent	40
2.4.3 Western Blot.....	40
2.4.4 Co-Immunoprecipitation	42
2.4.5 Two-step Co-Immunoprecipitation	42
2.4.6 GST-pulldown	43
2.4.7 Chromatin Immunoprecipitation Assay	44
2.4.8 Luciferase Assay.....	46
2.4.9 EMSA	47
2.4.10 Silver Staining	49
2.4.11 HDAC Enzyme Activity Assay.....	50
2.5 Methods on Cell.....	51
2.5.1 Cell Lines.....	51
2.5.2 Cell Cryopreservation.....	51
2.5.3 Cell Recovery	52
2.5.4 Cell Passage.....	52
2.5.5 PEI Transient Transfection	52
2.5.6 TurboFect Transient Transfection	52
2.5.7 Liposome Transient Transfection.....	53
2.5.8 Package and Infection of Lenti-viruse.....	53
2.5.9 Wound Healing Experiment	54
2.5.10 Cell Invasion Experiment	54

2.5.11 Cell Counting.....	54
2.5.12 Immunohistochemical Staining	55
RESULTS	56
3.1 OVOL2 Inhibits EMT Process in Colorectal Cancer Cells.....	56
3.1.1 High Correlation between OVOL2 and E-cadherin at Transcription Level	56
3.1.2 OVOL2 Protein Levels Vary in Different Colorectal Cancer Cells	57
3.1.3 OVOL2 Suppresses EMT in Colorectal Cancer Cells	59
3.2 OVOL2 Suppresses SLUG to Inhibit EMT Process in Colorectal Cancer Cells	63
3.2.1 SLUG and ZEB1 are Potential Target Genes of OVOL2	63
3.2.2 Effect of OVOL2 on EMT Can Be Rescued by SLUG	65
3.3 Mechanism of OVOL2 Suppressing SLUG in Colorectal Cancer Cells.....	67
3.3.1 OVOL2 Suppresses SLUG via Inhibition of WNT Signaling	67
3.3.2 OVOL2 Level has no Influence on Level of WNT Signaling Core Component β -catenin Protein	69
3.3.3 OVOL2 Interacts with Both β -catenin and TCF4 Directly	70
3.3.4 OVOL2 Has No Influence on Combination of β -catenin and TCF4.....	72
3.3.5 OVOL2 Has No Influence on Combination of TCF4 and DNA.....	73
3.3.6 OVOL2, β -catenin, TCF4 and HDAC1 Forms Transcription Complex	74
3.4 Methylation of OVOL2 Promoter Leads To Its Low Expression in Advanced Colorectal Cancer Cells	80
3.4.1 Discovery of OVOL2 Methylation Site and Primer Design.....	80
3.4.2 High Methylation Level of OVOL2 Promoter in Advanced Dukes Stage Colorectal Cancer Cells	81
Discussion	84
References	87
Acknowledgement	92

摘要

研究背景与研究目的：WNT 信号通路的激活对多种癌症的进展和转移有着促进作用，但其对于结肠癌的影响及作用机制还没有被广泛论证。OVO 蛋白家族在胚胎发育中起着重要的作用，而它在癌症及肿瘤中的研究却少之又少，本文中的 OVOL2 便是 OVO 蛋白家族中的一员，它是受 WNT 信号通路调控的，具有保守锌指结构的转录因子。本文主要研究了 OVOL2 在结直肠癌细胞中对上皮间质转化过程的影响及其作用机制。

研究方法与手段：在结直肠癌细胞系中利用免疫印迹及实时荧光定量 PCR 实验确定 OVOL2 的含量。利用慢病毒及 RNA 干扰技术使基因过表达或表达沉默；利用细胞划痕、Transwell 实验探究细胞迁移及侵袭能力的变化。利用 PCR Array 技术分析细胞内基因转录水平的变化；利用荧光素酶报告基因确定特定变化对基因转录活性的影响。利用免疫共沉淀实验研究蛋白间相互作用；利用染色质免疫共沉淀、凝胶迁移率实验研究蛋白与 DNA 间相互作用。利用 MSP、BSP 实验探究基因启动子甲基化水平变化。

研究结果：通过结直肠癌细胞中 OVOL2 含量分析发现 OVOL2 含量与 Dukes 分期呈负相关趋势；结合免疫印迹、免疫荧光、细胞划痕、Transwell 等实验结果发现 OVOL2 在结直肠癌细胞中对 EMT 过程有明显抑制作用；PCR Array 及荧光素酶报告基因检测实验指出了 OVOL2 是通过下调 SLUG 调控 EMT 进程的；而一系列分子实验表明 OVOL2 能够帮助 β -catenin/TCF4 转录复合体募集 HDAC1 以下调 WNT 信号通路下游靶基因 SLUG 的表达；而 MSP 及 BSP 实验结果则表明 OVOL2 在结直肠癌晚期的低表达可能与其启动子甲基化密切相关。

结论：OVOL2 能够抑制结直肠癌细胞的上皮间质转化作用，而实现这一过程是通过抑制 β -catenin/TCF4 转录复合体的活力抑制 SLUG 的表达。OVOL2 晚期的低表达可能是结直肠癌获得高侵袭能力的原因之一，而 OVOL2 启动子甲基化的调控机制还并不明确，针对 OVOL2 进一步研究有可能对阻止结直肠癌进展与转移起到重大的积极作用。

关键词：OVOL2；结直肠癌；上皮间质转化

Abstract

Background: Activation of WNT signaling pathway promotes development and metastasis of multiple cancers, but little it is demonstrated that its affection on colorectal cancer and what mechanism is involved. It is known that OVO protein family plays vital role in embryonic development, while only a few researches are related to its role in carcinomas. OVOL2, the member of OVO family regulated by Wnt signaling, is a transcription factor containing conserved zinc fingers. This paper studies the affection and mechanism of OVOL2 regulating epithelia mesenchyma transition in colorectal cancer cells.

Methods: Expression of OVOL2 in different colorectal cancer cell lines was analyzed by western blot and real-time fluorescence quantification PCR. Lentivirus and RNA interference technology were used to over expressing or silencing genes. Variations of cell migration and invasion ability were explored through cell-scratching and Transwell experiment. PCR array was performed to analysis gene transcription levels. Luciferase reporter experiment identified if gene transcription activity was influenced. Interactions between proteins were studied through Co-IP and interactions between protein and DNA were studied through Chromatin Immunoprecipitation and Gel shift experiment. MSP, BSP was used to explore variation of gene promoter methylation level.

Results: We found OVOL2 expression was negative correlated with Dukes Stage in colorectal cancer cells; OVOL2 obviously inhibits EMT procession in colorectal cancer cells; OVOL2 regulates EMT procession by downregulating SLUG; OVOL2 facilitates β -catenin/TCF4 transcription complex recruiting HDAC1 to downregulate expression of Wnt signaling target gene SLUG. MSP and BSP experiments demonstrate low expression of OVOL2 in advanced colorectal cancer was closely related with its promoter methylation.

Conclusions: OVOL2 inhibits colorectal cancer cell epithelia mesenchym

transition process by restrain transcription activity of β -catenin/TCF4 transcription complex to suppress SLUG expression. Low expression of OVOL2 in advanced colorectal cancer may be one reason of colorectal cancer's high invasive ability. However, the regulating mechanism of OVOL2 promoter methylation remains ambiguity. Further study on OVOL2 might be positive to reduce colorectal tumor progression and metastasis.

Keywords: OVOL2; colorectal cancer; epithelia mesenchysm transition

前言

1.1 Wnt 信号通路概述

1.1.1 Wnt 信号通路的发现

生物学意义上的信号通路指的是细胞内部对于外部刺激的一系列反应,近些年来,对于信号通路的研究趋于成熟化,相继从果蝇、线虫等模式生物以及细胞中发现了多条与生物体发育、代谢等过程密切相关的信号通路。一般来说,细胞外部的刺激因子(一般是脂质或多肽)与受体结合后,导致受体被激活,而后在细胞内引发一系列反应,最终导致细胞内的此通路各下游靶基因表达量的变化,从而影响相关的生命体进程^[1]。

Wnt 信号通路的刺激因子是一系列相似度很高的 Wnt 基因家族编码的分泌性蛋白,这类蛋白在不同物种体内具有高度的同源性^[2]。Wnt 蛋白包括 Wnt-1、Wnt-3、Wnt-3a、Wnt-7a、Wnt-2、Wnt-4、Wnt-5a、Wnt-5b、Wnt-6、Wnt-7b 和 Wnt-11 等^[3]。

Wnt 信号通路是一个在发育上高度保守的信号通路,最早发现于果蝇之中,由于与翅膀形成有关因而被命名为 Wg。而 Wnt 基因最早在脊椎动物中发现在 1982 年于乳腺癌小鼠中被发现,并在当时命名为 Int1^[4]。以上便是 Wnt (由 Wg 与 Int 组成)名称的由来。Wnt 信号通路直接或间接的参与并影响了细胞的分化及增殖等活动,在动物体发育中起到重要的作用,同时影响器官形成与肿瘤发生等重要生命体进程^[5]。

1.1.2 Wnt 信号通路的分类

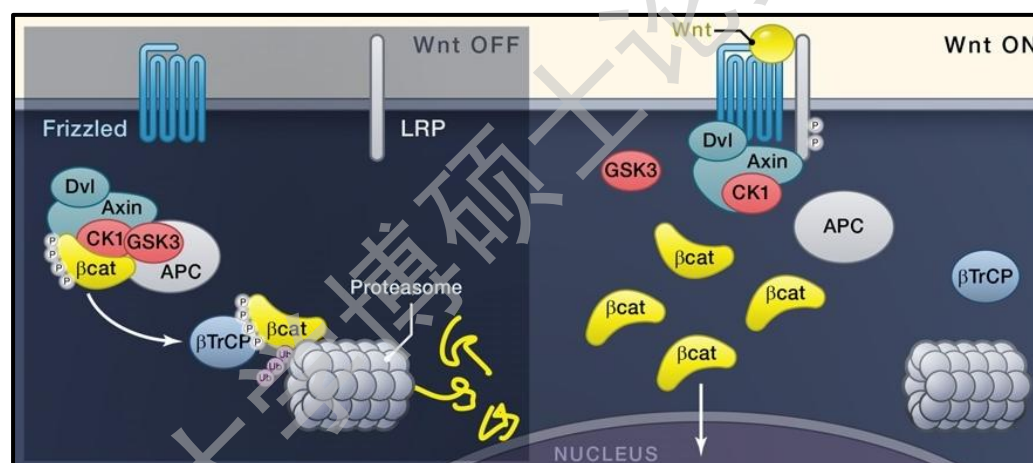
由于细胞内作用方式以及下游作用基因不同,Wnt 信号通路可以分为两大类,即经典 Wnt 信号通路和非经典 Wnt 信号通路^[6]。

经典 Wnt 信号通路一般意义上指 β -catenin/TCF 通路,通过增加转录共激活因子 β -catenin 的含量,使其与下游基因结合从而调控相关基因表达,进而影响胚胎发育等生命过程。非经典 Wnt 信号通路则主要分为平面极性细胞通路和钙

离子通道信号通路。平面极性细胞通路与 Jun 激酶和 RhoA 蛋白有关，可以对细胞骨骼重新排列起到作用，从而对胚胎发育进行阶段性的调控；而钙离子通道信号通路是由 Wnt5a 等刺激细胞使得细胞内 Ca^{2+} 含量增多，导致 Ca^{2+} 敏感的信号转导组分含量的变化，从而对细胞进行调控，有趣的是，钙离子通道信号通路可以对经典 Wnt 信号通路产生拮抗作用。

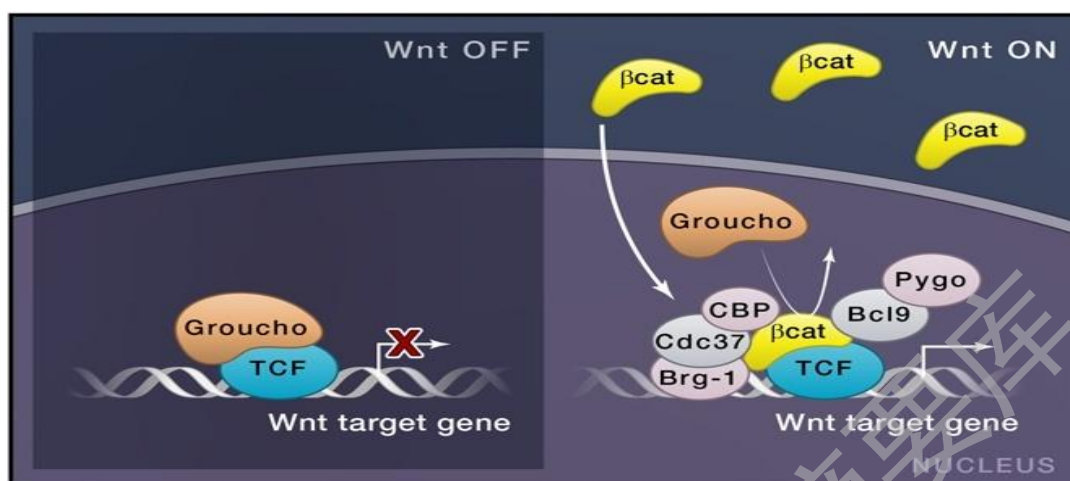
1.1.3 经典 Wnt 信号通路

经典 Wnt 信号通路本身是极为保守的，在多种的肿瘤形成和胚胎的发育中扮演重要的角色^[7,8]。经典 Wnt 信号通路与动物体组织发育过程及多种疾病有着密不可分的联系，经典 Wnt 信号通路的激活需要细胞内外的一系列作用和调控过程，在起到作用的各组分中， β -catenin 至关重要。



CLEVERS H, Cell, 2012, 149(6): 1192-205.

当 Wnt 信号未被激活时，胞浆中的 β -catenin 被由轴蛋白 (Axin)、结肠腺瘤样息肉蛋白 (Adenomatous polyposis coli, APC)、糖原合成激酶 3 (Glycogen synthase kinase-3, GSK-3) 和酪蛋白激酶 (Casein kinase 1, CK1) 组成的降解复合体磷酸化，磷酸化后的 β -catenin 会被 E3 泛素连接酶 β -TrCP 泛素化并最终为蛋白酶体所降解。通过这样的途径，细胞可以维持静息状态。当 Wnt 家族蛋白与细胞表面受体 Frizzled 结合时，Wnt 信号通路被激活，胞浆内的降解复合体解体从而被抑制， β -catenin 在胞浆大量累积并作为转录共激活因子入核与转录因子 LEF/TCF 蛋白结合，开启下游靶基因的转录^[9]。



CLEVERS H, Cell, 2012, 149(6): 1192-205.

Wnt 信号通路处于静息状态时，核内的 LEF/TCF 结合 Groucho、HDACS 等转录辅助抑制因子，使得下游靶基因处于沉默状态。而当 Wnt 信号被激活，β-catenin 大量进入细胞核后，会取代 Groucho 与转录因子 LEF/TCF 蛋白结合，并募集 CBP、Pygo、Bcl9 等辅助激活因子，从而激活下游靶基因的表达，并影响生物体的相关进程^[10]。

1.1.4 β-catenin 蛋白简介

1980 年由德国科学家发现了 β-catenin 蛋白，但当时认为此蛋白仅仅是一个粘附蛋白。后续研究表明 β-catenin 不仅是粘附蛋白，还有着多种功能^[11]。

β-catenin 蛋白由氨基端结构域、羧基端结构域和中间区结构域三部分组成。β-catenin 蛋白 N 端由约 130 个氨基酸组成，含有丰富的苏氨酸和丝氨酸，β-catenin 的 N 端可被 GSK-3 或 CK1 磷酸化，故而 N 端对于 β-catenin 蛋白的稳定存在具有重要的意义^[12]。C 端的 100 个氨基酸可以行使转录激活的功能，可以募集多种辅助激活因子，从而促进下游基因转录。中间区由 12 个重复的结构组成，每个单位含有 42 个氨基酸，β-catenin 的中间区域相对保守，在 Wnt 信号通路中与 Axin2、TCF4 等重要组分结合^[13]，使得 β-catenin 在 Wnt 信号通路中起到重要作用。

β-catenin 在细胞中主要以三种复合体方式行使生物学功能，分别位于细胞膜、

细胞质和细胞核。一般的大量 β -catenin 位于细胞膜上, 与 E-cadherin 结合, 由 α -catenin 和 actin 介导连接到细胞骨架上, 在细胞膜上形成 cadherin-actin 复合体, 影响细胞的粘附与迁移。当 β -catenin 被磷酸化后, 与 E-cadherin 的结合被破坏, 细胞粘附能力变弱^[14]。 β -catenin 在细胞质中被 GSK-3、APC、Axin、CK1 组成的降解复合体磷酸化, 而后被泛素化降解。当 Wnt 信号被激活, 降解复合体解体后 β -catenin 会在胞浆中累积并进入核内, 作为转录共激活因子与 LEF/TCF 蛋白结合后开启下游基因转录, 从而影响细胞周期、细胞增殖以及肿瘤的发生和转移^[15]。

1.1.5 LEF/TCF 蛋白简介

LEF/TCF 蛋白家族是能够识别特异性 DNA 序列的转录因子。自上世纪九十年代, 其成员 LEF1、TCF1、TCF4 等相继被发现并克隆。LEF/TCF 家族蛋白有一个共同的结构, 被称为高迁移率结构域, 即 HMG 结构域, 它可以帮助蛋白识别特异的(A/T)(A/T)CAA(A/T)GG 序列, 除此之外, HMG 结构域还能够通过协助 DNA 的二级折叠过程从而更利于其与转录因子的结合^[16]。

在 Wnt 信号通路中, LEF/TCF 家族蛋白在核内行使其功能, 并在 Wnt 信号中起到了分子开关的重要作用。LEF/TCF 家族在 Wnt 信号通路中有着至关重要的功能导向作用, 当 Wnt 信号未被激活时, LEF/TCF 家族蛋白募集 Groucho/TLE 蛋白和 CtBP 等辅助抑制因子, 从而导致了下游基因的表达沉默^[17]。当 Wnt 信号因某些刺激而被激活时, β -catenin 的降解被抑制, 并在胞浆内积累最终入核, 其在核内与前文提到的转录辅助抑制因子竞争性地结合 LEF/TCF 家族蛋白, 募集辅助激活因子, 从而开启下游基因转录。随着研究的一步步深入, 科学家们认为 TCF/LEF 家族并不是通过直接的方式调控下游基因的转录, 而是通过间接地募集转录共激活因子或转录共抑制因子以达到调控下游基因的目的^[18]。体内存在的 N 端缺失的 TCF4 蛋白能够抑制 Wnt 信号通路的活性也很好的诠释并证明了上述观点。TCF/LEF 家族蛋白在 Wnt 信号通路中的角色转变过程和开关作用, 在 Wnt 信号影响生物体发育及癌症的发生发展中都有着重大的影响^[19]。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.